

GLUCOSE DEHYDROGENASE

Patent Number: EP1167519

Publication date: 2002-01-02

Inventor(s): SODE KOJI (JP)

Applicant(s): SODE KOJI (JP)

Requested Patent: WO0061730

Application Number: EP20000915459 20000410

Priority Number (s): WO2000JP02322 20000410; JP19990101143 19990408; JP20000009152 20000118

IPC Classification: C12N9/04; C12N15/53; C12N15/63; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12Q1/32; C12Q1/54; C12N9/04; C12R1/01

EC Classification: C12Q1/00B6B

Equivalents: JP2000350588

Cited Documents:

Abstract

Modified water-soluble glucose dehydrogenase having pyrrolo-quinoline quinone as a coenzyme are provided wherein at least one amino acid residue is replaced by another amino acid residue in a specific region. Modified water-soluble PQQGDHs of the present invention have improved thermal stability.

Data supplied from the **esp@cenet** database - I2



<p>(51) 国際特許分類7 C12N 9/04, 15/53, 15/63, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12Q 1/32, 1/54 // (C12N 9/04, C12R 1:01)</p>		<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/61730</p>
			<p>(43) 国際公開日 2000年10月19日(19.10.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/02322</p> <p>(22) 国際出願日 2000年4月10日(10.04.00)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平11/101143 1999年4月8日(08.04.99) JP 特願2000/9152 2000年1月18日(18.01.00) JP</p> <p>(71) 出願人 ; および (72) 発明者 早出広司(SODE, Koji)[JP/JP] 〒152-0013 東京都目黒区南1-13-16 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 社本一夫, 外(SHAMOTO, Ichio et al.) 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 CA, CN, IL, KR, US, 欧州特許 (BE, DE, ES, FR, GB, IT, LU, NL)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54) Title: GLUCOSE DEHYDROGENASE</p> <p>(54) 発明の名称 グルコース脱水素酵素</p> <p>(57) Abstract A modified glucose dehydrogenase characterized in that, in a water soluble glucose dehydrogenase accompanied by pyrrolo-quinoline quinone as the coenzyme thereof, one or more amino acid residues in a specific region have been substituted by other amino acid residues. This water soluble PQQGDH has an improved heat stability.</p>			

ピロロキノリンキノンを補酵素とする水溶性グルコース脱水素酵素において、特定の領域において1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されていることを特徴とする改変型グルコース脱水素酵素が提供される。本発明の改変型水溶性PQQGDHは、改良された熱安定性を有する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スードン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スウェーデン
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴー
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドバ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサオ	共和国		TT	トリニダッド・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴー	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ベトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジエール	YU	ユーゴースラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノールウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明細書

グルコース脱水素酵素

5 技術分野

本発明はピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素 (PQQ GDH) の製造、およびグルコースの定量におけるその使用に関する。

背景技術

10 血中グルコース濃度は、糖尿病の重要なマーカーである。また、微生物を用いる発酵生産においては、プロセスをモニタリングするためにグルコース濃度を定量する。従来、グルコースはグルコースオキシダーゼ (GOD) あるいはグルコース6リン酸脱水素酵素 (G6PDH) を用いる酵素法により定量されていた。しかし、GODを用いる方法ではグルコース酸化反応にともない発生する過酸化水素を定量するためカタラーゼあるいはパーオキシダーゼをアッセイ系に添加する必要があった。G6PDHは分光学的手法に基づくグルコース定量に用いられてきたが、反応系に補酵素であるNAD (P) を添加しなければならない。

本発明は、改良された熱安定性を有する改変型水溶性PQQGDHを提供することを目的とする。

20

発明の開示

本出願人は、これまでのグルコース酵素定量方法に用いられてきた酵素にかわる新たな酵素として安定性の高いPQQGDHが有益であることを見いだした。PQQGDHはグルコースに対して高い酸化活性を有していること、およびPQQGDHは補酵素結合型の酵素であるため電子受容体として酸素を必要としないことから、グルコースセンサーの認識素子として有用である。

PQQGDHは、グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒する。PQQGDHには、膜結合性酵素と水溶性酵素がある。膜結合性PQQGDHは、分子量約87kDaのシングルペプチド蛋白質であり、種々のグラム

陰性菌において広く見いだされている。水溶性PQQGDHは*Acinetobacter calcoaceticus*のいくつかの株においてその存在が確認されており (Biosci. Biotech. Biochem. (1995), 59 (8), 1548-1555)、その構造遺伝子がクローニングされアミノ酸配列が明らかにされている (Mol. Gen. Genet. (1989), 217: 430-436)。*A. calcoaceticus*由来水溶性PQQGDHは、分子量約50kDaのホモダイマーである。

最近、オランダの研究者グループにより水溶性PQQGDHのX線結晶構造解析がおこなわれ、同酵素の高次構造が明かとなった (J.Mol.Biol., 289, 319-333(1999), The crystal structure of the apo form of the soluble quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus* reveals a novel internal conserved sequence repeat; A.Oubrie et al., The EMBO Journal, 18(19) 5187-5194 (1999), Structure and mechanism of soluble quinoprotein glucose dehydrogenase, A. Oubrie et al., PNAS, 96(21), 11787-11791 (1999), Active-site structure of the soluble quinoprotein glucose dehydrogenase complexed with methylhydrazine: A covalent cofactor-inhibitor complex, A. Oubrie et al.)。これらの論文によれば、水溶性PQQGDHは6つのW-モチーフから構成されるβプロペラ蛋白質である (図7)。

本発明者は従来の水溶性PQQGDHを改良してその熱安定性を高め、臨床検査や食品分析などに応用できる改変型PQQGDHを開発すべく鋭意研究を行なった結果、水溶性PQQGDHの特定の領域においてアミノ酸変異を導入することにより、安定性がきわめて高い酵素を得ることに成功した。

すなわち、本発明は、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus*由来水溶性PQQGDH (本明細書においては、野生型PQQGDHとも称される) の231番目のセリン残基に相当するアミノ酸残基、または209番目のグルタミン残基、または210番目のグルタミン酸残基、または420番目のアスパラギン酸残基、または421番目のアラニン残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素を提供する。本明細書

において「改変型グルコース脱水素酵素」とは、天然に存在するグルコース脱水素酵素の1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されているグルコース脱水素酵素を意味する。なお、本明細書においては、アミノ酸の位置は、開始メチオニンを1として番号付けする。

5 本発明はまた、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列番号1で表されるアミノ酸配列の、第48残基から53残基、第60残基から62残基、第69残基から71残基、第79残基から82残基、第91残基から101残基、第110残基から115残基、第127残基から135残基、第147残基から150残基、第161残基から169残基、第177から179残基、第186残基から221残基、第227残基から244残基、第250残基から255残基、第261残基から263残基、第271残基から275残基、第282残基から343残基、第349残基から377残基、第382残基から393残基、第400から403残基、第412残基から421残基、第427残基から432残基、第438残基から441残基および第449残基から468残基の領域からなる群より選択される1またはそれ以上の領域において、1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、*A cinetobacter calcoaceticus*由来水溶性PQQGDHより高い熱安定性を有することを特徴とする改変型グルコース脱水素酵素を提供する。好ましくは、本発明の改変型PQQGDHは、50℃で10分間熱処理した後の活性の残存率が天然型PQQGDHの活性の残存率より10%以上高く、より好ましくは20%以上高く、さらに好ましくは30%以上高い。また好ましくは、本発明の改変型PQQGDHは、55℃における熱失活半減期が天然型PQQGDHの熱失活半減期より5分以上長く、より好ましくは15分以上長い。本発明の特に好ましい改変型PQQGDHは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第227残基から244残基、第186残基から221残基または第412残基から421残基の領域において、1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている。さらに好ましくは、本発明の改変型PQQGDHは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の231番目のセリン残基が、リジン、アスパラギン、アスパラギン酸、ヒスチジン、メチオニン、ロイシンおよびシス

テインからなる群より選択されるアミノ酸残基で置換されているか、または 20
9 番目のグルタミン残基がリジン残基で、または 210 番目のグルタミン酸残基
がリジン残基で、または 420 番目のアスパラギン酸残基がリジン残基で、また
は 421 番目のアラニン残基がアスパラギン酸残基で置換されている。

5 また別の観点においては、本発明の改変型 PQQGDH は、配列：

Asn Leu Asp Gly Xaa231 Ile Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe Asn Gly Val Val Ser
[式中、Xaa231 は Ser 以外の天然アミノ酸残基である]

または配列：

Gly Asp Gln Gly Arg Asn Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn Gln Ala Gln

10 His Thr Pro Thr Gln Xaa209 Xaa210 Leu Asn Gly Lys Asp Tyr His Thr Tyr
Met Gly

[式中、Xaa209 および Xaa210 は任意の天然アミノ酸残基である、ただし、
Xaa209 が Gln であるとき、Xaa210 は Glu ではない]

または配列：

15 Pro Thr Tyr Ser Thr Thr Tyr Asp Xaa420 Xaa421

[式中、Xaa420 および Xaa421 任意の天然アミノ酸残基である、ただし、
Xaa420 が Asp であるとき、Xaa421 は Ala ではない]

を含む。

本発明はまた、上述の改変型グルコース脱水素酵素をコードする遺伝子、該遺
20 伝子を含むベクターおよび該遺伝子を含む形質転換体、ならびに本発明の改変型
グルコース脱水素酵素を含むグルコースアッセイキットおよびグルコースセンサ
ーを提供する。

本発明の改変型 PQQGDH の酵素蛋白質は高い熱安定性を有し、かつグルコ
ースに対して高い酸化活性を有していることから、グルコースの高感度かつ高選
25 択的な測定に応用できる。特に、酵素生産において調製／精製時の失活が少なく
収率が高い、溶液中での安定性が高く酵素の保存が容易である、本酵素を用いて
アッセイキットあるいは酵素センサーを作成する過程において失活が少なく、本
酵素を用いて作成されたアッセイキットあるいは酵素センサーの熱安定性が高い
ことから、保存性に優れるといった利点が期待される。

図面の簡単な説明

図1は、本発明において用いたプラスミドpGB2の構造を示す。

図2は、本発明の改変型酵素をコードする突然変異遺伝子を作成する方法を示す。

5

図3は、本発明の改変型酵素の熱安定性を示す。

図4は、本発明の改変型酵素の基質特異性を示す。

図5は、本発明の改変型PQQGDHを用いるグルコースのアッセイを示す。

図6は、本発明の改変型PQQGDHを用いる酵素センサーのキャリブレーションカーブを示す。

10

図7は、水溶性GDHのトポロジーを示す (Oubrie et al., Fig. 4)。

発明を実施するための最良の形態

改変型PQQGDHの構造

15

本発明者は、水溶性PQQGDHをコードする遺伝子のコーディング領域中にエラープローンPCR法によりランダムに変異を導入し、アミノ酸残基の変異が導入された水溶性PQQGDHのライブラリーを構築した。これを大腸菌に形質転換し、熱処理後のPQQGDHの残存活性についてスクリーニングして、熱安定性の向上したPQQGDHを発現する多数のクローンを得た。

20

これらのクローンの一つについて遺伝子配列を解析したところ、第231番目のSerがCysに置換されていることが判明した。さらにこの残基を種々の別のアミノ酸残基に置換したところ、いずれの残基に置換しても野生型水溶性PQQGDHよりも熱安定性に優れた変異酵素が得られた。

25

水溶性PQQGDHは6つのW-モチーフから構成される β プロペラ蛋白質の構造を有している。本発明においては、ループ領域の1つである第227残基から244残基の領域中の第231番目のSerを他のアミノ酸に置換することにより、熱安定性が向上することが見いだされた。次に、他のループ領域に関して部位特異的に変異を導入し、その熱安定性の向上を試みた。第186残基から221残基のループに存在する209番目のGlnをLysに、同210番目のG

1 uをLysに、第412残基から421残基のループに存在する420番目のAspをLysに、同421番目のAlaをAspに置換したところ、変異型酵素の熱安定性が向上した。

すなわち、本発明により、ループ領域中に適切な変異を導入することにより、
5 热安定性が向上した水溶性PQQGDHを構築しうることが立証された。これは、
水溶性PQQGDHにおいては、W-モチーフ間のループ領域の間の相互作用が
βプロペラ蛋白質の構造の安定化に寄与しているためであると考えられる。上記
に示したSer231、Gln209、Glu210、Asp420、Ala4
10 21残基は単なる例であり、本発明を限定するものではない。本発明は、ループ
領域の構造遺伝子の特定の部位に変異を導入することによりPQQGDHの熱安
定性を改良できることを当該技術分野において初めて明らかにしたものであり、
PQQGDHの熱安定性を改良する方法論がここで提供される。

本発明の改変型PQQGDHは、配列番号1で表される野生型PQQGDHの
アミノ酸配列中の特定の領域中にアミノ酸残基の変異を含むことを特徴とする。
15 すなわち、本発明は、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵
素において、配列番号1で表されるアミノ酸配列の、第48残基から53残基、
第60残基から62残基、第69残基から71残基、第79残基から82残基、
第91残基から101残基、第110残基から115残基、第127残基から1
35残基、第147残基から150残基、第161残基から169残基、第17
20 7から179残基、第186残基から221残基、第227残基から244残基、
第250残基から255残基、第261残基から263残基、第271残基から
275残基、第282残基から343残基、第349残基から377残基、第3
82残基から393残基、第400から403残基、第412残基から421残
基、第427残基から432残基、第438残基から441残基および第449
25 残基から468残基の領域からなる群より選択される1またはそれ以上の領域に
おいて、1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている
構造を有する、改変型PQQGDHを提供する。

本発明の好ましい改変型PQQGDHは、配列番号1で表されるアミノ酸配列
の第227残基から244残基、第186残基から221残基または第412残

基から 421 残基の領域において、1 またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている。さらに、本発明の特に好ましい改変型 PQQGDH は、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 231 番目のセリン残基が、リジン、アスパラギン、アスパラギン酸、ヒスチジン、メチオニン、ロイシンおよびシステインからなる群より選択されるアミノ酸残基で置換されているか、またはまたは 209 番目のグルタミン残基がリジン残基で、または 210 番目のグルタミン酸残基がリジン残基で、または 420 番目のアスパラギン酸残基がリジン残基で、または 421 番目のアラニン残基がアスパラギン酸残基で置換されている。

また別の観点においては、本発明の改変型 PQQGDH は、配列：

10 Asn Leu Asp Gly Xaa231 Ile Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe Asn Gly Val Val Ser
[式中、Xaa231 は Ser 以外の天然アミノ酸残基である]

または配列：

Gly Asp Gln Gly Arg Asn Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn Gln Ala Gln
His Thr Pro Thr Gln Xaa209 Xaa210 Leu Asn Gly Lys Asp Tyr His Thr Tyr

15 Met Gly

[式中、Xaa209 および Xaa210 は任意の天然アミノ酸残基である、ただし、Xaa209 が Gln であるとき、Xaa210 は Glu ではない]

または配列：

Pro Thr Tyr Ser Thr Thr Tyr Asp Xaa420 Xaa421

20 [式中、Xaa420 および Xaa421 任意の天然アミノ酸残基である、ただし、Xaa420 が Asp であるとき、Xaa421 は Ala ではない]

を含む。

本発明の改変型グルコース脱水素酵素においては、グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有する限り、さらに他のアミノ酸残基の一部が欠失または置換されてもよく、また他のアミノ酸残基が付加されていてもよい。そのようなアミノ酸残基の欠失、置換、付加のための種々の方法が当該技術分野において知られており、例えば、Sambrook ら、"Molecular Cloning: A Laboratory Manual"、第 2 版、1989、Cold Spring Harbor Laboratory Press、New York に記載されている。当業者は、本明細書の教示にしたがって、そのようなアミノ酸残基の欠失、置換、

付加を含むグルコース脱水素酵素が所望のグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有しているか否かを容易に試験することができる。さらに、当業者は、他の細菌に由来する水溶性 PQQGDH についても、本発明の教示にしたがってループ構造を有する領域を予測し、この領域内でアミノ酸残基を置換することにより、熱安定性の向上した改変型グルコース脱水素酵素を得ることができる。特に、蛋白質の一次構造を並列して比較することにより、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来の水溶性 PQQGDH の 231 番目のセリン残基、209 番目のグルタミン残基、210 番目のグルタミン酸残基、420 番目のアスパラギン酸残基、または 421 番目のアラニン残基に相当するアミノ酸残基を容易に認識することができ、本発明にしたがって、かかる残基を他のアミノ酸残基で置換して改変型グルコース脱水素酵素を得ることができる。これらの改変型グルコース脱水素酵素も本発明の範囲内である。

改変型 PQQGDH の製造方法

Acinetobacter calcoaceticus 由来の天然の水溶性 PQQGDH をコードする遺伝子の配列は配列番号 2 で規定される。

本発明の改変型 PQQGDH をコードする遺伝子は、天然の水溶性 PQQGDH をコードする遺伝子において、上述のループ領域中に存在するアミノ酸残基をコードする塩基配列を、変異すべきアミノ酸残基をコードする塩基配列に置換することにより構築することができる。このような部位特異的塩基配列置換のための種々の方法が当該技術分野において知られており、例えば、Sambrook ら、"Molecular Cloning; A Laboratory Manual"、第 2 版、1989、Cold Spring Harbor Laboratory Press、New York に記載されている。このようにして得た変異遺伝子を遺伝子発現用のベクター（例えばプラスミド）に挿入し、これを適当な宿主（例えば大腸菌）に形質転換する。外来性蛋白質を発現させるための多くのベクター・宿主系が当該技術分野において知られており、宿主としては例えば、細菌、酵母、培養細胞などの種々のものを用いることができる。

ランダム変異を導入する場合には、標的とするループ領域においてエラーブローン PCR 法によりランダムに変異を導入し、ループ領域に変異が導入された変異水溶性 PQQGDH 遺伝子ライブラリーを構築する。これを大腸菌に形質転換

し、PQQGDHの熱安定性について各クローンをスクリーニングする。水溶性PQQGDHは大腸菌において発現させたときにペリプラズム空間に分泌されるため、菌体そのものを用いて容易に酵素活性の検定を行うことができる。このライブラリーを60-70°Cで約30分処理した後に、グルコースおよび色素としてPMS-DCIPを加え、残存するPQQGDHの活性を目視により判定して、熱処理によっても残存活性を示すクローンを選択し、遺伝子配列を解析してその変異を確認する。

上述のようにして得られた、改変型PQQGDHを発現する形質転換体を培養し、培養液から遠心分離などで菌体を回収した後、菌体をフレンチプレスなどで破碎するか、またはオスモティックショックによりペリプラズム酵素を培地中に放出させる。これを超遠心分離し、PQQGDHを含む水溶性画分を得ることができる。あるいは、適当な宿主ベクター系を用いることにより、発現したPQQGDHを培養液中に分泌させることもできる。得られた水溶性画分を、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、HPLCなどにより精製することにより、本発明の改変型PQQGDHを調製する。

酵素活性の測定方法

本発明のPQQGDHは、PQQを補酵素として、グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒する作用を有する。

酵素活性の測定は、PQQGDHによるグルコースの酸化にともなって還元されるPQQの量を酸化還元色素の呈色反応により定量することができる。呈色試薬としては、例えば、PMS（フェナジンメトサルフェート）-DCIP（2,6-ジクロロフェノールインドフェノール）、フェリシアン化カリウム、フェロセンなどを用いることができる。

熱安定性

本発明の改変型PQQGDHの熱安定性は、酵素を高温（例えば55°C）でインキュベートし、一定時間ごとにアリコートを取り出して酵素活性を測定し、時間経過にともなう酵素活性の低下をモニターすることにより評価することができる。典型的には、酵素の熱安定性は、熱失活半減期、すなわち酵素活性が50%に減少するまでに要する時間($t_{1/2}$)を指標として表される。あるいは、熱安

定性は、酵素を所定時間熱処理した後の酵素活性の残存率（熱処理前の活性に対する熱処理後の活性の比）で表すことができる。

本発明の改変型PQQGDHは、野生型PQQGDHと比較して高い熱安定性を有することを特徴とする。このため、酵素生産において調製／精製時の失活が

5 少なく収率が高い、溶液中での安定性が高く酵素の保存が容易である、本酵素を用いてアッセイキットあるいは酵素センサーを作成する過程において失活が少なく、本酵素を用いて作成されたアッセイキットあるいは酵素センサーの熱安定性が高いことから、保存性に優れるなどの利点を有する。

グルコースアッセイキット

10 本発明はまた、本発明に従う改変型PQQGDHを含むグルコースアッセイキットを特徴とする。本発明のグルコースアッセイキットは、本発明に従う改変型PQQGDHを少なくとも1回のアッセイに十分な量で含む。典型的には、キットは、本発明の改変型PQQGDHに加えて、アッセイに必要な緩衝液、メディエーター、キャリブレーションカーブ作製のためのグルコース標準溶液、ならびに使用の指針を含む。本発明に従う改変型PQQGDHは種々の形態で、例えば、凍結乾燥された試薬として、または適切な保存溶液中の溶液として提供することができる。好ましくは本発明の改変型PQQGDHはホロ化した形態で提供されるが、アポ酵素の形態で提供し、使用時にホロ化することもできる。

15

グルコースセンサー

20 本発明はまた、本発明に従う改変型PQQGDHを用いるグルコースセンサーを特徴とする。電極としては、カーボン電極、金電極、白金電極などを用い、この電極上に本発明の酵素を固定化する。固定化方法としては、架橋試薬を用いる方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で被覆する方法、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーなどがあり、あるいはフェロセンあるいはその誘導体に代表される電子メディエーターとともにポリマー中に固定あるいは電極上に吸着固定してもよく、またこれらを組み合わせて用いてよい。好ましくは本発明の改変型PQQGDHはホロ化した形態で電極上に固定化するが、アポ酵素の形態で固定化し、PQQを別の層としてまたは溶液中で提供することもできる。典型的には、グルタルアルデヒドを用いて本発明の改変型PQQ

25

G D H をカーボン電極上に固定化した後、アミン基を有する試薬で処理してグルタルアルデヒドをブロッキングする。

グルコース濃度の測定は、以下のようにして行うことができる。恒温セルに緩衝液を入れ、PQQおよびCaCl₂、およびメディエーターを加えて一定温度

5 に維持する。メディエーターとしては、フェリシアン化カリウム、フェナジンメトサルフェートなどを用いることができる。作用電極として本発明の改変型PQQGDHを固定化した電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg/AgCl電極）を用いる。カーボン電極に一定の電圧を印加して、電流が定常になった後、グルコースを含む試料を加えて電流の増加を測定する。標準濃度のグルコース溶液により作製したキャリブレーションカーブに従い、試料中のグルコース濃度を計算することができる。

本明細書において明示的に引用される全ての特許および参考文献の内容は全て引用により本明細書に取り込まれるものとする。また、本出願が有する優先権主張の基礎となる出願である日本特許出願平成11-101143号および200

15 0-9152号の明細書に記載の内容は全て引用により本明細書に取り込まれるものとする。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されることはない。

20 実施例 1

変異PQQGDH遺伝子ライブラリの構築およびスクリーニング

プラスミドpGB2は、ベクターpTrc99A（ファルマシア社製）のマルチクローニング部位に、Acinetobacter calcoaceticus 由来PQQGDHをコードする構造遺伝子を挿入したものである（図1）。このプラスミドをテンプレートとして、エラーブローンPCR法によりコーディング領域中にランダムに変異を導入した。PCR反応は、表1に示す組成の溶液中で、94°C 3分間、次に、94°C 3分間、50°C 2分間、および72°C 2分間を30サイクル、最後に72°Cで10分間の条件で行った。

表1

Taq DNAポリメラーゼ (5 U/ μ l)	0. 5 μ l
テンプレートDNA	1. 0 μ l
5 フォワードプライマーABF	4. 0 μ l
リバースプライマーABR	4. 0 μ l
10 \times Taq ポリメラーゼバッファー	10. 0 μ l
1M β -メルカプトエタノール	1. 0 μ l
DMSO	10. 0 μ l
10 5 mM MnCl ₂	10. 0 μ l
10 mM dGTP	2. 0 μ l
2 mM dATP	2. 0 μ l
10 mM dCTP	2. 0 μ l
10 mM dTTP	2. 0 μ l
15 H ₂ O	51. 5 μ l
	100. 0 μ l

得られた変異水溶性PQQGDHのライブラリーを大腸菌に形質転換し、形成された各コロニーをマイクロタイタープレートに移した。プレートを60°Cで約20分熱処理した後に、グルコースおよびPMS-DCIPを加え、残存するPQQGDHの活性を目視で判定した。熱処理後においてもPQQGDHの活性を示すクローンが多数得られた。

このうち1つのクローンを任意に選び、遺伝子配列を解析したところ、第231番目のセリンがシステインに変異していたことがわかった。

25 実施例2

改変型酵素PQQGDH遺伝子の構築

配列番号2に示される *Acinetobacter calcoaceticus* 由来PQQGDHの構造遺伝子をもとに、常法に従って部位特異的変異法により231番目のセリン残基、209番目のグルタミン残基、210番目のグルタミン酸残基、420番目のア

スパラギン酸残基、または421番目のアラニン残基をコードする塩基配列を所定のアミノ酸残基をコードする塩基配列に置換した。部位特異的変異はプラスミドpGB2を用いて、図2に示す方法により行った。変異に用いた合成オリゴヌクレオチドターゲットプライマーの配列を表2に示す。表2においては、例えば5 「S231D」は、231番目のセリンがアスパラギン酸に置換されていることを表す。

表2

10	S231D	5'-C CTT TGG AAT ATC TCC ATC AAG ATT TAA GC-3'
	S231H	5'-C CTT TGG AAT ATG TCC ATC AAG ATT TAA GC-3'
	S231K	5'-C CTT TGG AAT TTT TCC ATC AAG ATT TAA GC-3'
	S231L	5'-C CTT TGG AAT CAT TCC ATC AAG ATT TAA GC-3'
	S231M	5'-C CTT TGG AAT AGT TCC ATC AAG ATT TAA GC-3'
15	S231N	5'-C CTT TGG AAT ATT TCC ATC AAG ATT TAA GC-3'
	I278F	5'-C AAT GAG GTT GAA TTC ATC GTC AGA G-3'
	Q209K	5'-G ACC ATT CAG TTC TTT TTG AGT TGG C-3'
	E210K	5'-G ACC ATT CAG TTT TTG TTG AGT TGG C-3'
	D420K	5'-A CAT CGG TAC AGC TTT ATC ATA AGT AG-3'
20	A421D	5'-A CAT CGG TAC ATC GTC ATC ATA AGT AG-3'
		ベクタープラスミドpKF18k（宝酒造（株））にAcinetobacter calcoaceticus由来PQQGDHをコードする遺伝子の一部を含むKpn I-Hind III断片を組み込み、これをテンプレートとした。このテンプレート50fmolと宝酒造（株）製Mutant（登録商標）-Express Kmキットに付属の25セレクションプライマー5pmol、リン酸化したターゲットプライマー50pmolを全体（20μl）の1/10量の同キットのアニーリングバッファーとともに混合し、100℃、3分間の熱処理でプラスミドを変性させ、1本鎖にした。セレクションプライマーはpKF18kのカナマイシン耐性遺伝子上にある二重のアンバー変異を復帰させるためのものである。これを5分間氷上に置き、プライ

マーをアニーリングさせた。これに3 μ lの同キットエクステンションバッファー、1 μ lのT4 DNAリガーゼ、1 μ lのT4 DNAポリメラーゼおよび5 μ lの滅菌水を加えて相補鎖を合成した。

これをDNAのミスマッチ修復能欠損株である E.coli B M H 7 1 - 1 8 5 mutS に形質転換し、一晩振とう培養を行ってプラスミドを増幅させた。

次に、ここから抽出したプラスミドを E.coli M V 1 1 8 4 に形質転換し、そのコロニーからプラスミドを抽出した。そしてこれらのプラスミドについてシークエンスを行い、目的とした変異の導入を確認した。この断片を、プラスミド p G B 2 上の野生型PQQGDHをコードする遺伝子の Kpn I-Hind III 断片と入れ替え、改変型PQQGDHの遺伝子を構築した。 10

実施例 3

改変型酵素の調製

野生型または改変型PQQGDHをコードする遺伝子を、E. c o l i 用の発現ベクターである p T r c 9 9 A (ファルマシア社) のマルチクローニングサイトに挿入し、構築されたプラスミドを E.coli D H 5 α 株に形質転換した。これを4 5 0 m l のL培地 (アンピシリン5 0 μ g / m l、クロラムフェニコール3 0 μ g / m l 含有) で坂口フラスコを用いて3 7 $^{\circ}$ Cで一晩振とう培養し、1 mM C a C l ₂、5 0 0 μ M P Q Q を含む7 1 のL培地に植菌した。培養開始後約3 時間でイソプロピルチオガラクトシドを終濃度0. 3 mMになるように添加し、 20 その後1. 5 時間培養した。培養液から遠心分離 (5000 \times g、1 0 分、4 $^{\circ}$ C) で菌体を回収し、この菌体を0. 8 5 % N a C l 溶液で2回洗浄した。集菌した菌体をフレンチプレスで破碎し、遠心分離 (10000 \times g、1 5 分、4 $^{\circ}$ C) で未破碎の菌体を除去した。上清を超遠心分離 (160500 \times g (40000r.p.m.)、9 0 分、4 $^{\circ}$ C) し、水溶性画分を得た。これを粗精製酵素標品として以下の実施例において用いた。 25

さらに、こうして得た水溶性画分を1 0 mMリン酸緩衝液p H 7. 0で一晩透析した。透析したサンプルを1 0 mMリン酸緩衝液p H 7. 0で平衡化した陽イオン交換クロマトグラフィー用充填カラムT S K g e 1 C M - T O Y O P E A R L 6 5 0 M (東ソー株式会社) に吸着させた。このカラムを1 0 mMリン酸

緩衝液 pH 7.0、750 ml で洗浄した後、0-0.2 M NaCl を含む 1
 0 mM リン酸緩衝液 pH 7.0 を用い、酵素を溶出させた。流速は 5 ml/min で行った。GDH 活性を有する画分を回収し、10 mM MOPS-NaOH 緩衝液 (pH 7.0) で一晩透析した。このようにして電気泳動的に均一な改変
 5 型 PQQGDH 蛋白質を得た。これを精製酵素標品として以下の実施例において用いた。

実施例 4

酵素活性の測定

酵素活性の測定は 10 mM MOPS-NaOH 緩衝液 (pH 7.0) 中において PMS (フェナジンメトサルフェート) - DCIP (2,6-ジクロロフェノールインドフェノール) を用い、DCIP の 600 nm の吸光度変化を分光光度計を用いて追跡し、その吸光度の減少速度を酵素の反応速度とした。このとき、1 分間に 1 μ mol の DCIP が還元される酵素活性を 1 ユニットとした。また、DCIP の pH 7.0 におけるモル吸光係数は 16.3 mM⁻¹とした。

実施例 5

粗精製酵素標品の熱安定性の評価

実施例 3 で得られた野生型および各改変型 PQQGDH の粗精製酵素標品をそれぞれ 1 μ MPQQ、1 mM CaCl₂ 存在下で 1 時間以上ホロ化した後、5
 5 °C でインキュベートした。一定時間ごとにアリコートを取り出し、氷上で急冷
 20 した。これらのサンプルの酵素活性を実施例 4 の方法に従って測定し、活性が 50 % に低下するのに要する時間 ($t_{1/2}$) として表した。

結果を表 3 に示す。

表 3

25

	$t_{1/2}$ (分)
野生型	10
S 231K	95
S 231L	16

	S 2 3 1 D	2 5
	S 2 3 1 C	5 0
	S 2 3 1 M	1 4
	S 2 3 1 H	1 5
5	S 2 3 1 N	5 0
	I 2 7 8 F	2 5
	Q 2 0 9 K	4 0
	E 2 1 0 K	4 0
	D 4 2 0 K	2 0
10	<u>A 4 2 1 D</u>	<u>8 0</u>

本発明の改変型 PQQGDH の 55℃における熱失活の半減期はいずれも野生型 PQQGDH の 55℃における熱失活の半減期より長く、野生型 PQQGDH と比較して高い熱安定性を有することがわかる。

15 実施例 6

精製酵素標品の熱安定性の評価

実施例 3 で得られた野生型酵素および S 2 3 1 K 改変型酵素の精製酵素標品を用いて、実施例 5 と同様に 55℃における熱失活の半減期を測定した。野生型の精製酵素の熱失活の半減期は 5 分であり、S 2 3 1 K 改変型酵素の熱失活の半減期は 41 分であった。

次に、実施例 3 で得られた野生型酵素および S 2 3 1 K 改変型酵素の精製酵素標品をそれぞれ 1 μMPQQ、1 mM CaCl₂ 存在下で 1 時間以上ホロ化した。次に、1 μMPQQ、1 mM CaCl₂、10 mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) 中で、指示された温度で 10 分間インキュベートした後、氷上で急冷した。これらの試料の酵素活性を実施例 4 の方法に従って測定し、熱処理前の活性に対する残存活性として表した。

結果を図 3 に示す。S 2 3 1 K 改変型酵素は、40℃から 62.5℃までの各温度において、野生型酵素と比較して高い活性を有していた。

実施例 7

酵素活性の評価

実施例3で得られたS 2 3 1 K改変型酵素の粗精製酵素標品をそれぞれ $1 \mu M$ PQQ、 $1 mM$ $CaCl_2$ 存在下で1時間以上ホロ化した。これを $187 \mu l$ ずつ分注し、 $3 \mu l$ の活性試薬（ $6 mM DCIP 48 \mu l$ 、 $600 mM PMS 8 \mu l$ 、 $10 mM$ リン酸緩衝液pH 7.0 $16 \mu l$ ）および各濃度のD-グルコース溶液 $10 \mu l$ を加え、実施例4に示す方法により室温で酵素活性を測定した。基質濃度対酵素活性のプロットから、 K_m および V_{max} を求めた。S 2 3 1 Kのグルコースに対する K_m 値は約 $20 mM$ であり、 V_{max} 値は $3300 U/mg$ であった。これまで報告されている野生型PQQGDHのグルコースに対する K_m 値は約 $20 mM$ であり、 V_{max} 値は測定上件により $2500 - 7000 U/mg$ である。この結果から、S 2 3 1 K改変型PQQGDHは、野生型PQQGDHに匹敵する高い活性を有する酵素であることがわかる。

実施例8

基質特異性の評価

各改変型酵素の粗精製酵素標品について基質特異性を調べた。基質として、それぞれ $20 mM$ のグルコース、および2-デオキシ-D-グルコース、マンノース、アロース、3-オ-メチル-D-グルコース、ガラクトース、キシロース、ラクトースおよびマルトースを用い、 $1 \mu M$ PQQおよび $1 mM$ $CaCl_2$ の存在下で30分間インキュベートして、実施例7と同様に酵素活性を測定した。値はグルコースを基質としたときの活性に対する相対活性で表した。図4に示されるように、本発明の改変型酵素はいずれも野生型酵素と同様の基質特異性を示した。

実施例9

グルコースのアッセイ

改変型PQQGDHを用いてグルコースをアッセイした。S 2 3 1 K改変型酵素を、 $1 \mu M$ PQQ、 $1 mM$ $CaCl_2$ 存在下で1時間以上ホロ化し、各種濃度のグルコースおよび $5 \mu M$ PQQ、 $10 mM$ $CaCl_2$ 存在下で酵素活性を測定した。方法は実施例4に記載の酵素活性の測定法に準じ、DCIPの $600 nm$ の吸光度の変化を指標とした。図5に示されるように、S 2 3 1 K改変型P

QQ GDHを用いて、5 mM - 50 mMの範囲でグルコースの定量を行うことができる。

実施例 10

酵素センサーの作製および評価

5 5 UのS 2 3 1 K改変型酵素にカーボンペースト 20 mg を加えて凍結乾燥させた。これをよく混合した後、既にカーボンペーストが約 40 mg 充填されたカーボンペースト電極の表面だけに充填し、濾紙上で研磨した。この電極を 1 % のグルタルアルデヒドを含む 10 mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) 中で室温で 30 分間処理した後、20 mM リジンを含む 10 mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) 中で室温で 20 分間処理してグルタルアルデヒドをプロッキングした。この電極を 10 mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) 中で室温で 1 時間以上平衡化させた。電極は 4°C で保存した。

10 15 作製した酵素センサーを用いてグルコース濃度の測定を行った。得られたキャリブレーションカーブを図 6 に示す。すなわち、本発明の改変型 PQQ GDH を固定化した酵素センサーを用いて、1 mM - 12 mM の範囲でグルコースの定量を行うことができた。

産業上の利用性

20 改変型 PQQ GDH は熱安定性に優れていることから、酵素生産において調製／精製時の失活が少なく収率が高い、溶液中での安定性が高く酵素の保存が容易である、本酵素を用いてアッセイキットあるいは酵素センサーを作成する過程において失活が少なく、本酵素を用いて作成されたアッセイキットあるいは酵素センサーの熱安定性が高いことから、保存性に優れるといった利点が期待される。

請求の範囲

1. ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、*A cinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性 PQQGDH の 231 番目のセリン残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。
2. ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、*A cinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性 PQQGDH の 209 番目のグルタミン残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。
3. ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、*A cinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性 PQQGDH の 210 番目のグルタミン酸残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。
4. ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、*A cinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性 PQQGDH の 420 番目のアスパラギン酸残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。
5. ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、*A cinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性 PQQGDH の 421 番目のアラニン残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。
6. ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の、第 48 残基から 53 残基、第 60 残基から 62 残基、第 69 残基から 71 残基、第 79 残基から 82 残基、第 91 残基から 101 残基、第 110 残基から 115 残基、第 127 残基から 135 残基、第 147 残基から 150 残基、第 161 残基から 169 残基、第 177 から 179 残基、第 186 残基から 221 残基、第 227 残基から 244 残基、第 250 残基から 255 残基、第 261 残基から 263 残基、第 271 残基から 275 残基、

第 282 残基から 343 残基、第 349 残基から 377 残基、第 382 残基から 393 残基、第 400 から 403 残基、第 412 残基から 421 残基、第 427 残基から 432 残基、第 438 残基から 441 残基および第 449 残基から 468 残基の領域からなる群より選択される 1 またはそれ以上の領域において、1 またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性グルコース脱水素酵素と比較して高い熱安定性を有することを特徴とする改変型グルコース脱水素酵素。

7. 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 227 残基から 244 残基の領域において、1 またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている、請求項 3 に記載の改変型グルコース脱水素酵素。

8. 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 231 番目のセリン残基が、他のアミノ酸残基で置換されている、請求項 7 記載の改変型グルコース脱水素酵素。

9. 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 186 残基から 221 残基の領域において、1 またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている、請求項 3 に記載の改変型グルコース脱水素酵素。

10. 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 209 番目のグルタミン残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている、請求項 9 記載の改変型グルコース脱水素酵素。

20 11. 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 210 番目のグルタミン酸残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている、請求項 9 記載の改変型グルコース脱水素酵素。

12. 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 412 残基から 421 残基の領域において、1 またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている、請求項 3 に記載の改変型グルコース脱水素酵素。

13. 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 420 番目のアスパラギン酸残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている、請求項 12 記載の改変型グルコース脱水素酵素。

14. 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 421 番目のアラニン残基に相当

するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている、請求項 1 2 記載の改変型グルコース脱水素酵素。

15. 配列：

Asn Leu Asp Gly Xaa231 Ile Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe Asn Gly Val Val Ser

5 [式中、Xaa231 は Ser 以外の天然アミノ酸残基である]

を含む、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

16. 配列：

Gly Asp Gln Gly Arg Asn Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn Gln Ala Gln

His Thr Pro Thr Gln Xaa209 Xaa210 Leu Asn Gly Lys Asp Tyr His Thr Tyr

10 Met Gly

[式中、Xaa209 および Xaa210 は任意の天然アミノ酸残基である、ただし、

Xaa209 が Gln であるとき、Xaa210 は Glu ではない]

を含む、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

17. 配列：

15 Pro Thr Tyr Ser Thr Thr Tyr Asp Xaa420 Xaa421

[式中、Xaa420 および Xaa421 任意の天然アミノ酸残基である、ただし、

Xaa420 が Asp であるとき、Xaa421 は Ala ではない]

を含む、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

18. 請求項 1 – 1 7 のいずれかに記載の改変型グルコース脱水素酵素をコ

20 ドする遺伝子。

19. 請求項 1 8 に記載の遺伝子を含むベクター。

20. 請求項 1 8 に記載の遺伝子を含む形質転換体。

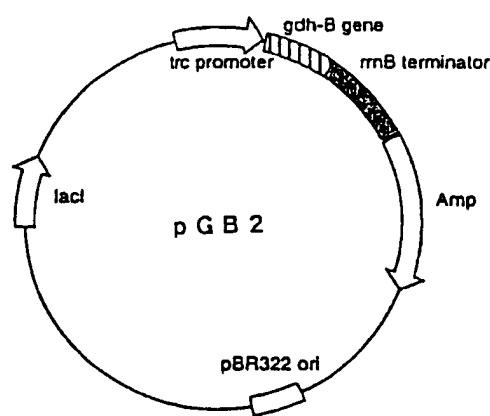
21. 遺伝子が主染色体に組み込まれている、請求項 2 0 記載の形質転換体。

22. 請求項 1 – 1 7 のいずれかに記載の改変型グルコース脱水素酵素を含む

25 グルコースアッセイキット。

23. 請求項 1 – 1 7 のいずれかに記載の改変型グルコース脱水素酵素を含む
グルコースセンサー。

図 1



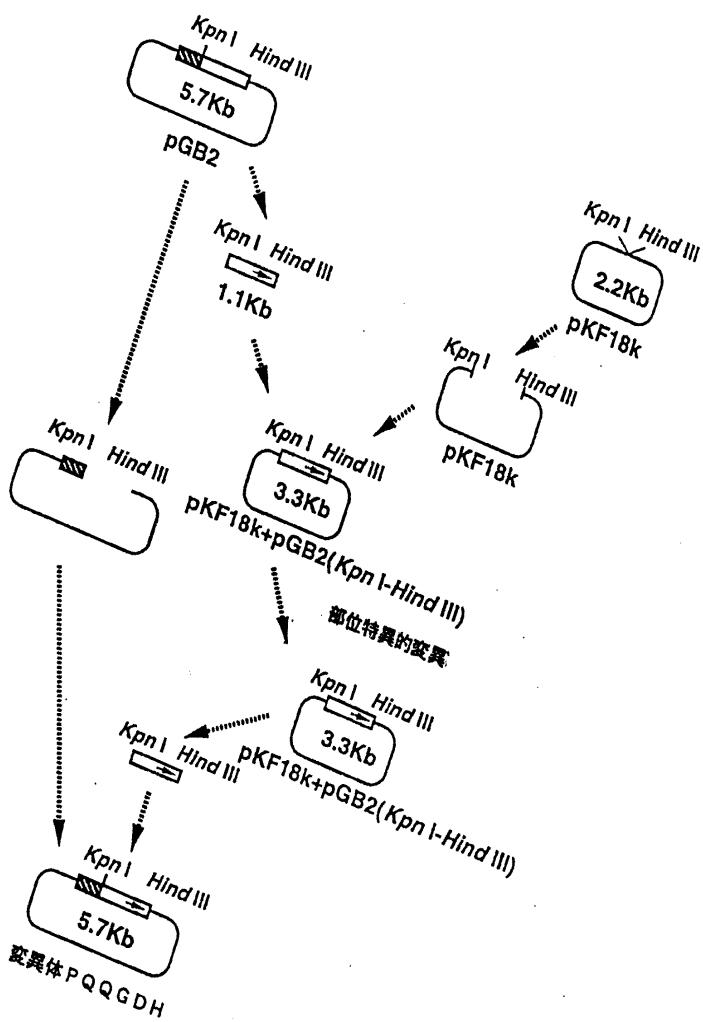


図 3

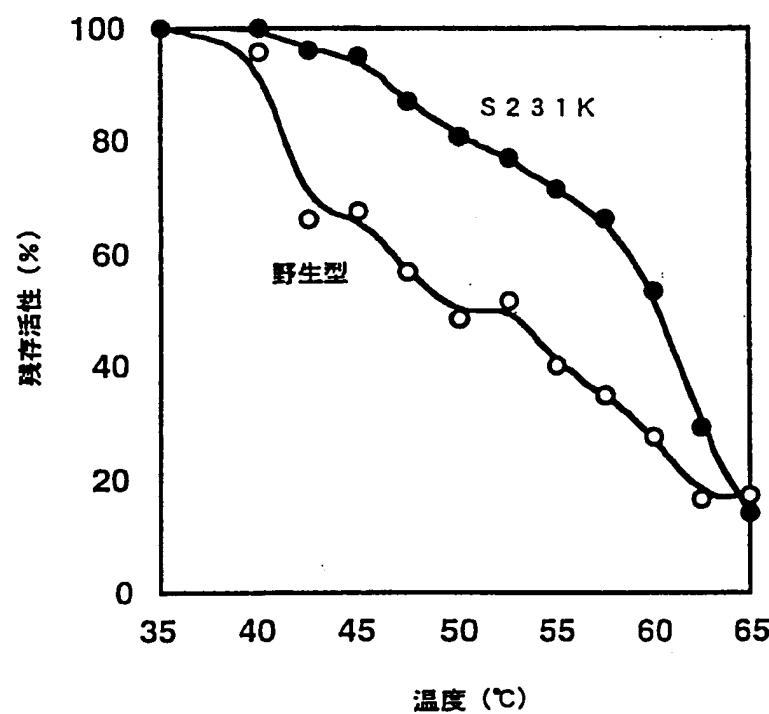


図 4

	試験	S231K	S231C	S231L	S231D	S231N	S231M	S231H
グルコース	100	100	100	100	100	100	100	100
2-デオキシ-D-グルコース	4	5	3	2	6	5	5	2
マンノース	13	10	8	9	13	12	9	12
アロース	47	43	46	38	62	61	43	57
3-0-メチル-D-グルコース	81	82	76	71	105	109	80	86
ガラクトース	11	15	14	12	20	18	10	17
キシロース	7	5	8	8	12	15	8	7
ラクトース	61	59	69	54	73	66	56	56
マルトース	61	70	69	38	76	51	41	38

図 5

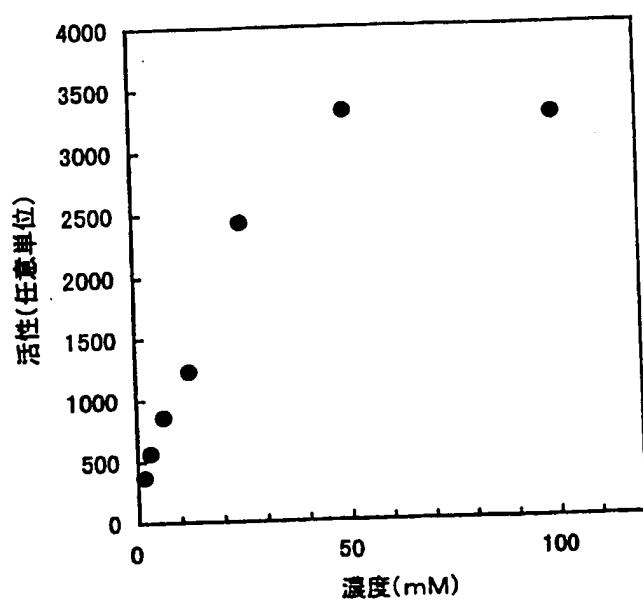


図 6

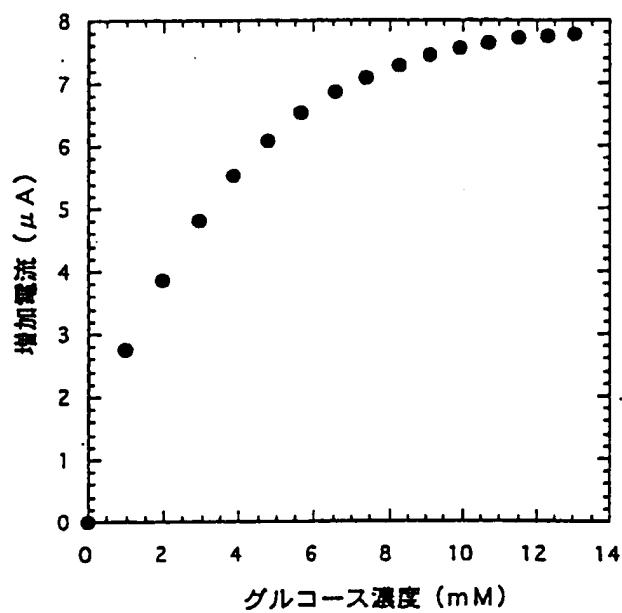
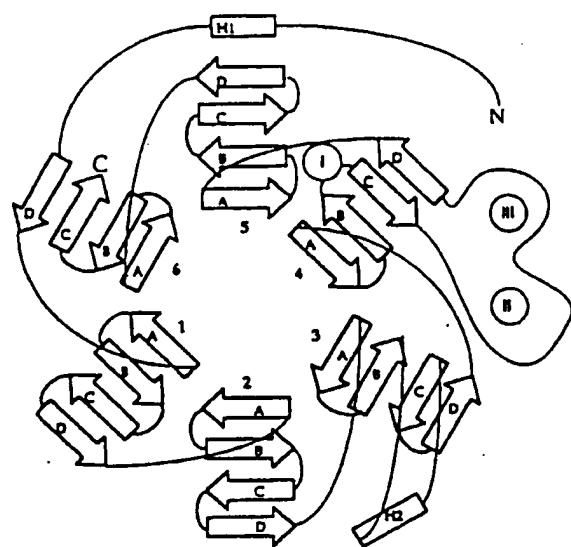


図 7



Sequence Listing

<110> Sode, Koji
<120> Glucose Dehydrogenase
5 <130> YCT477
<150> JP 11-101143
<151> 1999-4-8
<150> JP 2000-9152
<151> 2000-1-18
10 <160> 16
<210> 1
<211> 454
<212> PRT
<213> *Acinetobacter calcoaceticus*
15 <400> 1
Asp Val Pro Leu Thr Pro Ser Gln Phe Ala Lys Ala Lys Ser Glu Asn
1 5 10 15
Phe Asp Lys Lys Val Ile Leu Ser Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu
20 25 30
20 Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln Ile Trp Leu Thr Glu Arg Ala Thr Gly
35 40 45
Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro Glu Ser Gly Ser Val Lys Thr Val Phe
50 55 60
Gln Val Pro Glu Ile Val Asn Asp Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu
25 65 70 75 80
Gly Phe Ala Phe His Pro Asp Phe Lys Asn Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile
85 90 95
Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro Lys Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn
100 105 110

Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr Thr Tyr Asn Lys Ser Thr Asp Thr Leu
 115 120 125
 Glu Lys Pro Val Asp Leu Leu Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His
 130 135 140
 5 Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr
 145 150 155 160
 Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn
 165 170 175
 Gln Ala Gln His Thr Pro Thr Gln Gln Glu Leu Asn Gly Lys Asp Tyr
 10 180 185 190
 His Thr Tyr Met Gly Lys Val Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Ile
 195 200 205
 Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe Asn Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr
 210 215 220
 15 Leu Gly His Arg Asn Pro Gln Gly Leu Ala Phe Thr Pro Asn Gly Lys
 225 230 235 240
 Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu
 245 250 255
 Ile Val Lys Gly Gly Asn Tyr Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys
 20 260 265 270
 Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Asn Lys
 275 280 285
 Ser Ile Lys Asp Leu Ala Gln Asn Gly Val Lys Val Ala Ala Gly Val
 290 295 300
 25 Pro Val Thr Lys Glu Ser Glu Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro Pro
 305 310 315 320
 Leu Lys Thr Leu Tyr Thr Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro
 325 330 335
 Thr Cys Gly Glu Met Thr Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser

	340	345	350
	Ser Ala Tyr Val Tyr Lys Gly Gly Lys Lys Ala Ile Thr Gly Trp Glu		
	355	360	365
	Asn Thr Leu Leu Val Pro Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg Ile		
5	370	375	380
	Lys Leu Asp Pro Thr Tyr Ser Thr Thr Tyr Asp Asp Ala Val Pro Met		
	385	390	395
	390		
	Phe Lys Ser Asn Asn Arg Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Asp Gly		
	405	410	415
10	Asn Val Leu Tyr Val Leu Thr Asp Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys Asp		
	420	425	430
	Asp Gly Ser Val Thr Asn Thr Leu Glu Asn Pro Gly Ser Leu Ile Lys		
	435	440	445
	Phe Thr Tyr Lys Ala Lys		
15	450		

<210> 2

<211> 1612

<212> DNA

20 <213> *Acinetobacter calcoaceticus*

<400> 2

agctactttt atgcaacaga gcctttcaga aattttagatt ttaatagatt cgttattcat 60

cataatacaa aicatataga gaactcgtac aaacccttta tttagaggttt aaaaattctc 120

ggaaaatttt gacaatttat aaggtggaca catgaataaa cattttatgg ctaaaattgc 180

25 tttattaagc gctgttcagc tagttacact' ctcagcattt gctgtatgttc ctcttaactcc 240

atctcaattt gctaaagcga aatcagagaa ctttgacaag aaagtttttc tatctaatct 300

aaataagccg catgctttgt tatggggacc agataatcaa atttggtaa ctgagcgagc 360

aacaggtaag attctaaagag ttaatccaga gtcgggtagt gtaaaaacag tttttcaggt 420

accagagatt gtcataatgtg ctgtatggca gaatggttta tttaggttttgc cttccatcc 480

tgatTTaaa aataatccTT atatctatTT ttcaggtaca TTaaaaatc cggaaatctac 540
agataaagaa TTaccgaacc aaacgattat tcgtcgTTat acciataata aatcaacaga 600
tacgctcgag aagccagtcg atttattagc aggattacT tcatcaaaag accatcagtc 660
aggcgtcTT gtcatTTggc cagatcaaaa gatttattat acgatTTggc accaaggggc 720
5 taaccagcTT gcttatttgt tctTgccaTT tcaagcacaa catacgccaa cTcaacaaga 780
acigaatggT aaagactatc acacctatTT gggTaaagta ctacgcTTaa acTTtgatgg 840
aagtattcca aaggataatc caagtTTaa cggggTggTT agccatTTT atacactTTgg 900
acatcgtaat ccgcagggCT tagcattcac tccaaatggT aaattttgc agtctgaaca 960
aggcccAAC tctgacgatg aaatttaacT cattgtcaaa ggtggcaatt atggttggcc 1020
10 gaatgttagca ggttataaaag atgatagtgg ctatgcTTat gcaaatttatt cagcagcagc 1080
caataagtca attaaggatt tagctcaaaa Tggagtaaaa gtagccgcag gggTcccTTgt 1140
gacgaaagaa tctgaatggT ctggtaaaaa cTTTgtcccc ccattaaaaa cTTTataac 1200
cgttcaagat acctacaact ataacgatcc aacttggta gagaTgacTt acatttgcTg 1260
gccaacagtt gcaccgtcat ctgcctatgt ctataaggc ggtaaaaaag caattactgg 1320
15 ttggaaaaat acattttgg TTccatcttT aaaacgtggT gtcatTTTcc gtattaagtT 1380
agatccaact tatagcacta cTTatgtga cgctgtaccg atgttiaaga gcaacaaccg 1440
ttatcgTgtat gtgattgca a gtcaggatgg gaatgtcTTa tatgtattaa ctgatactgc 1500
cgaaaatgtc caaaaagatg atggcTcagt aacaaataca ttagaaaacc caggatctcT 1560
cattaaagtTC acctataagg ctaagtaata cagtcgcatt aaaaaaccga tc 1612

20

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> *Acinetobacter calcoaceticus*

25 <220>

<222> 4

<223> Xaa is any amino acid residue

<400> 3

Asn Leu Asp Gly Xaa Ile Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe Asn Gly Val

1 5 10 15

Val Ser

5 <210> 4

5 <211> 36

<212> PRT

<213> *Acinetobacter calcoaceticus*

<220>

<222> 24

10 <223> Xaa is any amino acid residue

<222> 25

<223> Xaa is any amino acid residue

<400> 4

Gly Asp Gln Gly Arg Asn Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn Gln

15 1 5 10 15

Ala Gln His Thr Pro Thr Gln Xaa Xaa Leu Asn Gly Lys Asp Tyr His

20 20 25 30

Thr Tyr Met Gly

35

20

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> *Acinetobacter calcoaceticus*

25 <220>

<222> 9

<223> Xaa is any amino acid residue

<222> 10

<223> Xaa is any amino acid residue

<400> 5

Pro Thr Tyr Ser Thr Thr Tyr Asp Xaa Xaa

1

5

10

5 <210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10 <223> primer for point mutation

<400> 6

cctttggaat atctccatca agat ttaa gc 30

<210> 7

15 <211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

20 <400> 7

cctttggaat atgtccatca agat ttaa gc 30

<210> 8

<211> 30

25 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 8

cctttggaat tttccatca agat ttaa gc 30

<210> 9

<211> 30

5 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 9

10 cctttggaat cattccatca agat ttaa gc 30

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

15 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 10

cctttggaat agttccatca agat ttaa gc 30

20

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

25 <220>

<223> primer for point mutation

<400> 11

cctttggaat atttccatca agat ttaa gc 30

<210> 12
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
5 <220>
<223> primer for point mutation
<400> 12
caatgagggtt gaattccatcg tcagag 26

10 <210> 13
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
15 <223> primer for point mutation
<400> 13
gaccattcag ttccttttga gttggc 26

<210> 14
20 <211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer for point mutation
25 <400> 14
gaccattcag tttttgttga gttggc 26

<210> 15
<211> 26

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer for point mutation
5 <400> 15
acatcggtac agctttatca taagtag 27

<210> 16
<211> 26
10 <212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer for point mutation
<400> 16
15 acatcggtac atcgatcatca taagtag 27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02322

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 Int.Cl' C12N 9/04, 15/53, 15/63, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12Q 1/32, 1/54
 // (C12N 9/04, C12R 1:01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' C12N 9/04, 15/53, 15/63-869, 1/14-21, 5/10-28, C12Q 1/32, 1/54

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 WPI/L (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE, JICST
 FILE (JOIS), CA (STN), REGISTRY (STN),
 GenBank/EMBL/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	JP, 11-243949, A (TOYOB0 CO., LTD.), 14 September, 1999 (14.09.99) (Family: none)	1-23
P, X	IGARASHI, S. et al. "Construction and characterization of mutant water-soluble PQQ glucose dehydrogenases with altered K(m) values--site-directed mutagenesis studies on the putative active site.", Biochem. Biophys. Res. Commun. (1999, Nov.) Vol.264, No.3, pp.820-824	1-23
Y	CLETON-JANSEN, A.-M., et al., "Cloning, Characterization and DNA sequencing of the gene encoding the Mr 50000 quinoprotein glucose dehydrogenases from <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> .", Mol. Gen. Genet. (1989, Jun.) Vol.217, No.2-3, pp.430-436	1-23
Y	US, 5114853, A (Amano Pharmaceutical Co., Ltd.), 19 May, 1992 (19.05.92) & JP, 2-86779, A & DE, 3931716, A	1-23
A	YOSHIDA, H. et al., "Engineering a chimeric pyrroloquinoline quinone glucose dehydrogenases:	1-23

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 27 April, 2000 (27.04.00)	Date of mailing of the international search report 16 May, 2000 (16.05.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02322

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	improvement of EDTA tolerance, thermal stability and substrate specificity.", Protein Eng. (1999, Jan.) Vol.12, No.1, pp.63-70	
A	SODE, K. et al., "Increased production of recombinant pyrroloquinoline quinone (PQQ) glucose dehydrogenase by metabolically engineered <i>Escherichia coli</i> strain capable of PQQ biosynthesis.", J. Biotechnol. (1996, Aug.) Vol.49, No.1-3, pp.239-243	1-23
A	EP, 78636, A (GENETICS INT., INC.), 11 May, 1983 (11.05.83) & US, 4545382, A & AU, 8289722, A & CA, 1212146, A	22-23

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 9/04, 15/53, 15/63, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12Q 1/32, 1/54
//(C12N 9/04, C12R 1:01)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 9/04, 15/53, 15/63-869, 1/14-21, 5/10-28, C12Q 1/32, 1/54

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI/L(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), MEDLINE, JICSTファイル(JOIS), CA(STN), REGISTRY(STN), GenBank/EMBL/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	JP, 11-243949, A (東洋紡績株式会社) 14. 9月. 1999(14. 09. 99) (ファミリーなし)	1-23
P, X	IGARASHI, S. et al. "Construction and characterization of mutant water-soluble PQQ glucose dehydrogenases with altered K(m) values—site-directed mutagenesis studies on the putative active site.", Biochem. Biophys. Res. Commun. (1999, Nov.) Vol. 264, No. 3, p. 820-824	1-23

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 04. 00

国際調査報告の発送日

6.05.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生

印:

4 N 2937

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C(続き) .	関連すると認められる文献	関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	CLETON-JANSEN, A. -M. , et al. "Cloning, Characterization and DNA sequencing of the gene encoding the Mr 50000 quinoprotein glucose dehydrogenases from <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> .", Mol. Gen. Genet. (1989, Jun.) Vol. 217, No. 2-3, p. 430-436	1-23
Y	US, 5114853, A (Amano Pharmaceutical Co., Ltd.) 19. 5月. 1992 (19. 05. 92) & JP, 2-86779, A & DE, 3931716, A	1-23
A	YOSHIDA, H. et al. "Engineering a chimeric pyrroloquinoline quinone glucose dehydrogenases: improvement of EDTA tolerance, thermal stability and substrate specificity.", Protein Eng. (1999, Jan.) Vol. 12, No. 1, p. 63-70	1-23
A	SODE, K. et al. "Increased production of recombinant pyrroloquinoline quinone(PQQ) glucose dehydrogenase by metabolically engineered <i>Escherichia coli</i> strain capable of PQQ biosynthesis.", J. Biotechnol. (1996, Aug.) Vol. 49, No. 1-3, p. 239-243	1-23
A	EP, 78636, A (GENETICS INT., INC.) 11. 5月. 1983(11. 05. 83) & US, 4545382, A & AU, 8289722, A & CA, 1212146, A	22-23